

Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*

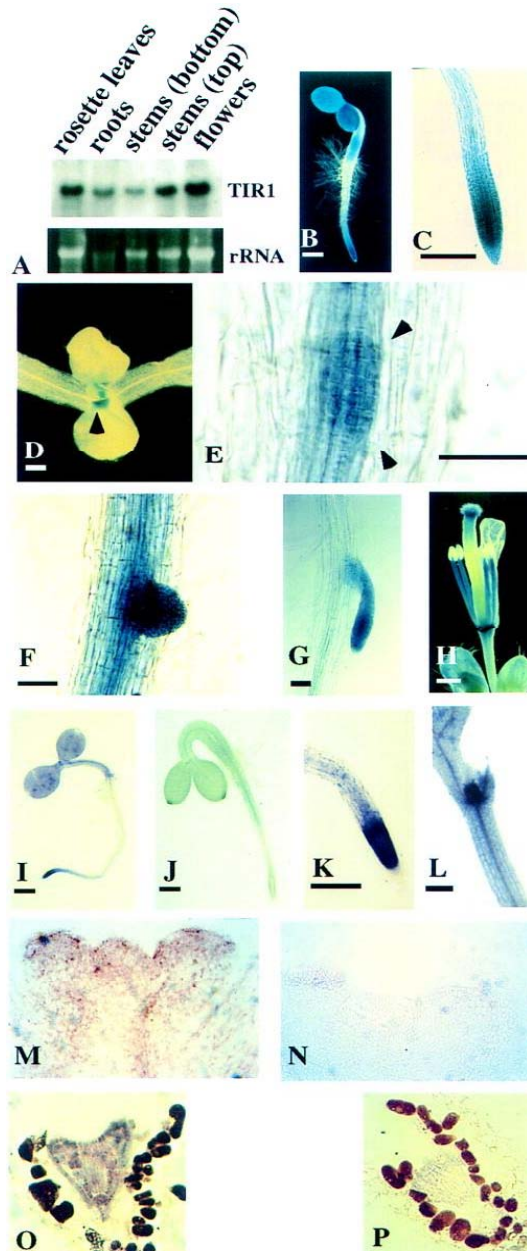
Vorbetrachtung

- TIR1 ist nötig für Auxinresponse, ist Komponente des Ubiquitin-Ligasekomplexes der Proteine ubiquitiniert→Proteolyse
- TIR1 und AXR1 regulieren über Proteolyse:
 - Metabolische Reaktionen
 - Zellzyklen
 - Differentiation
- axr1, axr4 und tir1 rezessiv →verminderter Auxinresponse u. Wachstumsdefekte → überschneidender Pathway
- RUB (Related to Ubiquitin) bindet an AXR1 + ECR1 (E1)
 - ist für ubiquitinierung nötig, bindet aber nicht an SCF-Targetprotein

β -Glucoronidase Reporter System

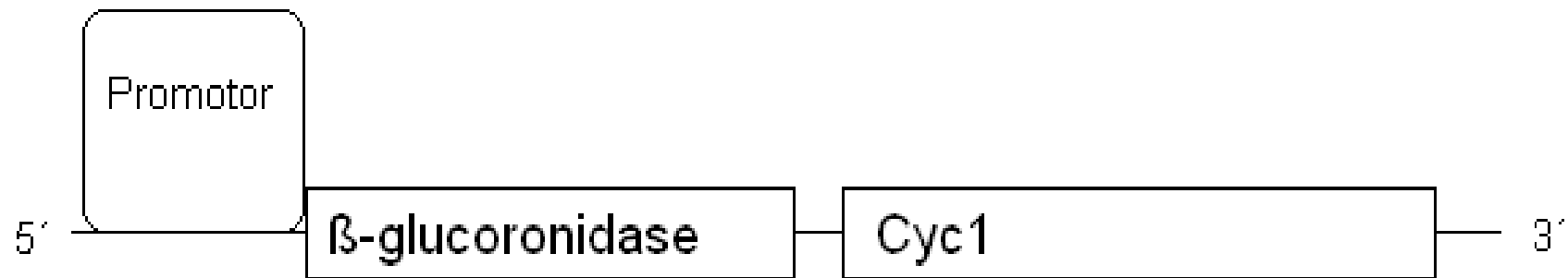


- Aus E.coli
- Analyse der Reporteraktivität
- transformiert farblose Substanz → blaue Färbung

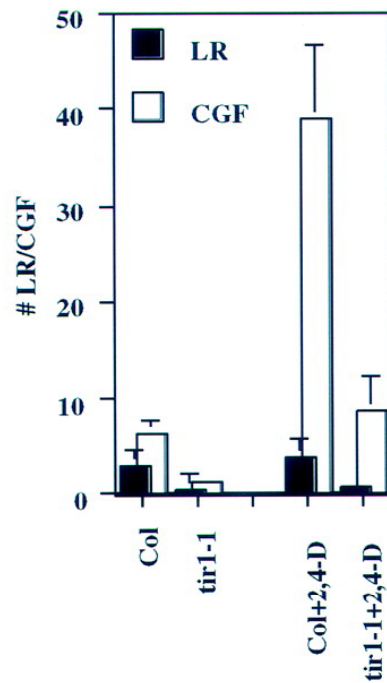


- A: zeigt Existenz von TIR1 in allen Geweben(Northern Hybridisation)
- GUS-reporter-system
- B: TIR1 in Wurzelspitze, Hypokotyl und Kotyledonen
- C: Wurzelspitze
- D: in Nebenblättern und Apikalmeristem
- E: vaskuläres Gewebe
- F: sich entwickelnde Lateralwurzel (Perizykel)
- G:entwickelte Lateralwurzel
- H: Blüte
- in-situ RNA-Hybridisierung mit TIR1 mRNA
- I: Setzling (3 Tage alt)
- K: Wurzelspitze
- L: Stengel
- M: Spitzenapikalmeristem
- O: Embryo (mit Keimblättern)
- J,N,P: Sense Strand Control Hybridisation

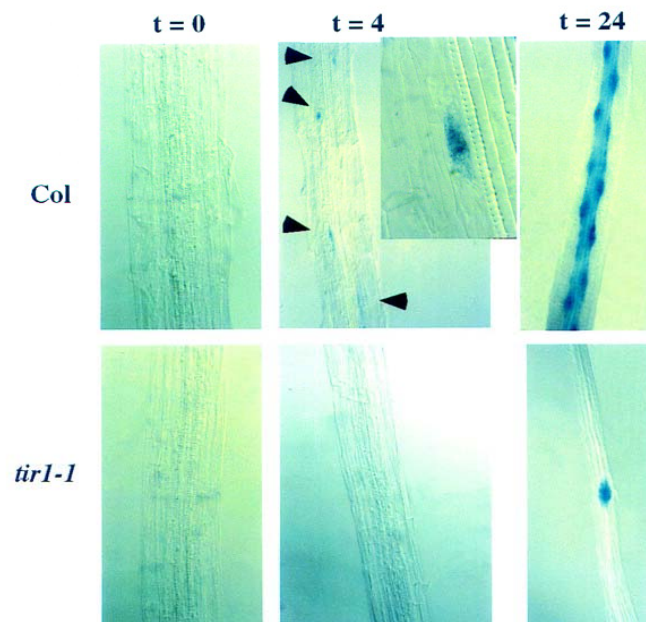
TIR1-Rolle bei Seitenwurzelentwicklung



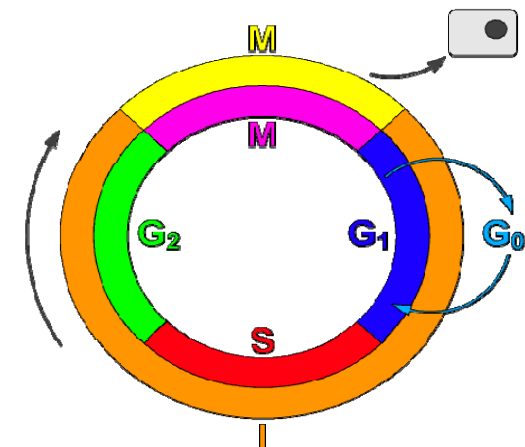
A



B

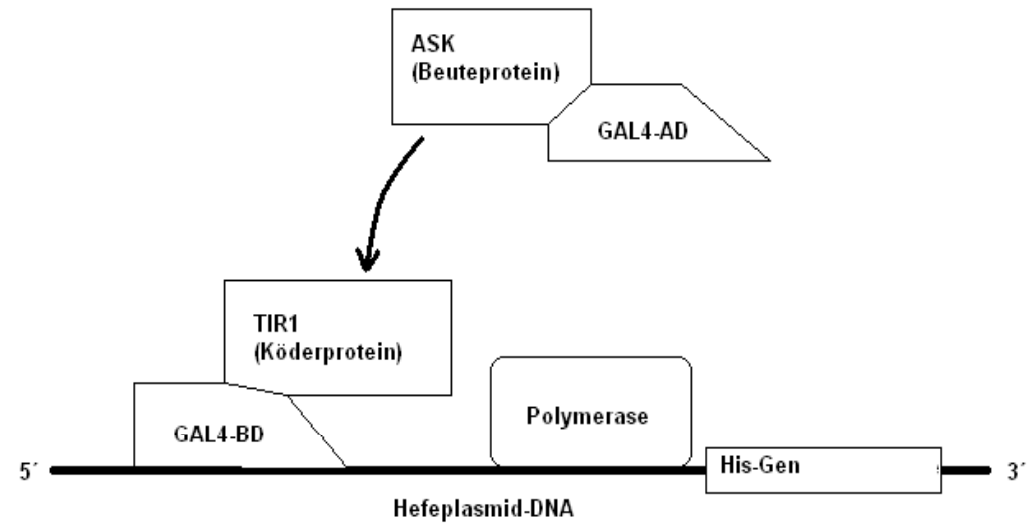


- *cyc1AT* steuert Zellzyklen, ist gus-markiert
- CGF: *cyc1At*-GUS Foci
- LR: Lateral Roots
- *cyc1At* vor TIR1 → gleich viele Spots in Mutante wie im WT
- Auxininduzierte Zunahme der Lateralwurzeln/ CGFs im WT, in *tir1-1* Mutante geringer
- TIR1 wird wahrscheinlich zur Überwindung des G₂-Stadiums gebraucht → Übergang in Mitose



Yeast-Two-Hybrid-Screen

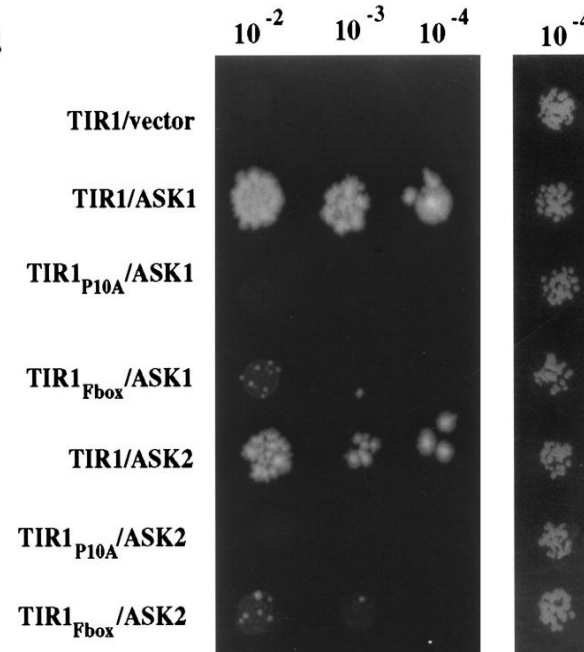
- GAL4 ist dimerer Promotor aus Hefen
- Besteht aus Bindedomäne und Aktivierungsdomäne an die jeweils ein Protein als „Beute“ oder „Köder“ gehängt werden kann, Voraussetzung:
 - Domänen jeweils auf unterschiedlichen Plasmiden kodiert
- Aus den mRNAs von TIR1/ ASKs wurde cDNA gewonnen die in Hefepiasmid insertiert wurde
- Kommt es zur Konjugation der beiden angehängten Proteine→ Expressierung



A

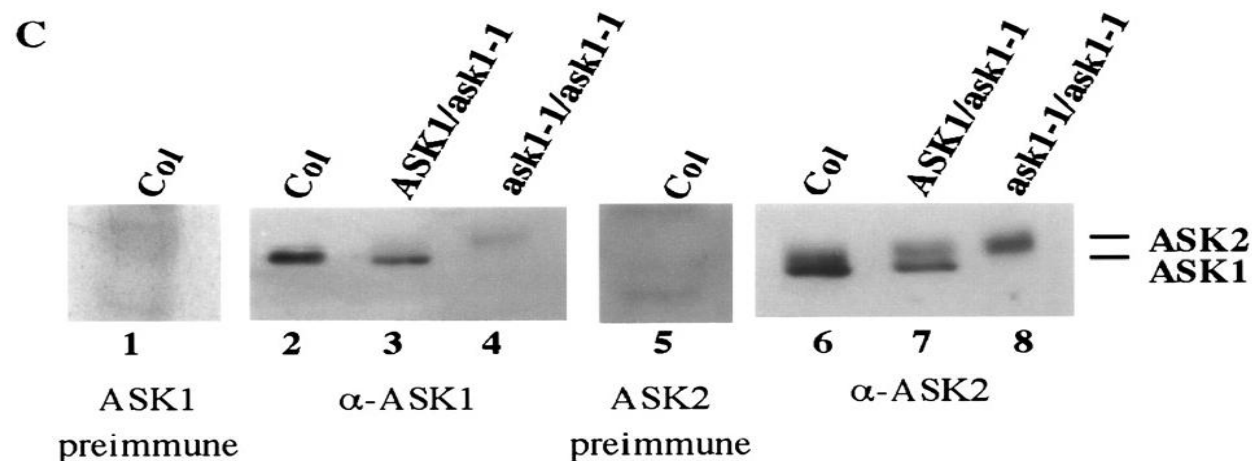
ASK2	*****	*****	*****	~MSTVRKIT	LKSSDGE*FE
ASK1	*****	*****	*****	~MS-AKIV	LKSSDGE*FE
HsSklp1	*****	*****	*****	~HPSIK	LQSSDGE*FE
ScSklp1	MVTSNVVLVS	GEGERFTVDK	KIAERSLLLK	NYLNDMEDSN	LQNNSDSDSD
ASK2	IDEAVALESQ	TIKHHIE...	DDCVDNGV	PLPNVTSKIL	SKVIEYCKRH
ASK1	IDEAVALESQ	TIKHHIE...	DDCVDNGV	PLPNVTSKIL	AKVIEYCKRH
HsSklp1	VDVEELKQSV	HIKHELEOLG	MDDEGDDGV	PLPNVAAIL	AKVLCWCTEH
ScSklp1	SPSETNERSK	DNNNGODDDE	DDDETIV...M	PVPNVRSVL	QKVIEMAKH
ASK2	VEAAKSEET	ADAAATTT	TVASGSDGD	LKWDSEFIK	VDQGLTFELL
ASK1	VEAAAKAEA	VEGAA...	...TSDD	LKWDALFMK	VDQGLTFELL
HsSklp1	KDDEPPFED	DENKERTDD	IFWDDSEFIK	VDQGLTFELL
ScSklp1	RDSNFPDED	DSRKSAP..	VDSWDRFLK	VDQLLVEILL
ASK2	LAANYLNLIK	LLDLTCQVA	DMIKGKTPEE	IRKTFNIKND	FTPEEEVEVR
ASK1	LAANYLNLIK	LLDLTCQVA	DMIKGKTPEE	IRKTFNIKND	FTPEEEVEVR
HsSklp1	LAANYLLIK	LLDLTCQVA	DMIKGKTPEE	IRKTFNIKND	FT_EEEAQR
ScSklp1	LAANYLNLIK	LLDAGCKVA	DMIGASPEE	IRKTFNIVND	FTPEEEAAR
ASK2	RENQWAFE*				
ASK1	RENQWAFE*				
HsSklp1	RENQWAFE*				
ScSklp1	RENQWAFR				

B

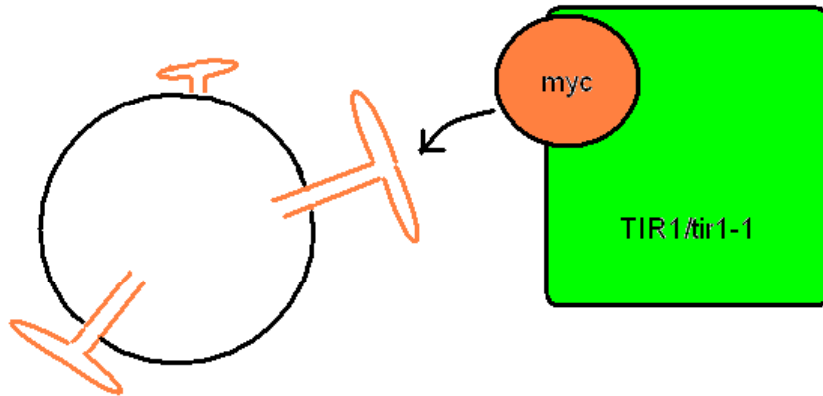


Immunpräzipitation

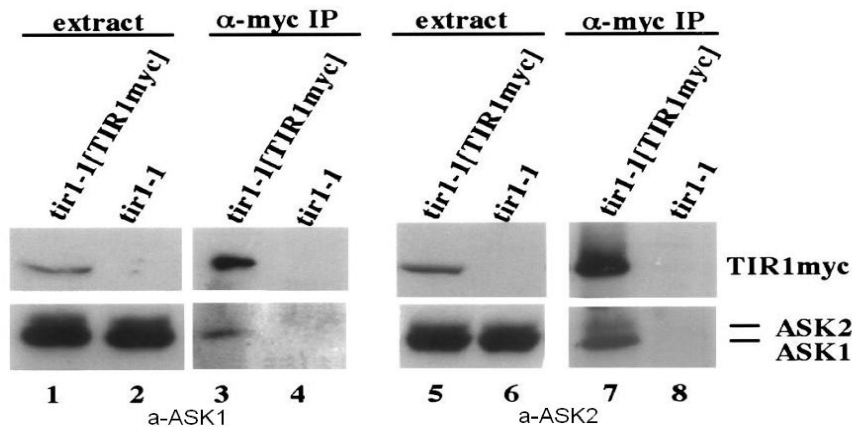
- ASK1 und ASK2 wurden in E.coli eingebracht, damit E.coli Antikörper bildet → Extraktion von α -ASK Seren
- Western-Blot mit Pflanzensextrakten:
 - Proteingemisch mittels Gelelektrophorese aufgetrennt
 - senkrecht einwirkendes elektrisches Feld zieht Proteine auf Membran
 - durch hydrophobe Wechselwirkungen bleiben sie haften
 - nach Waschvorgang nehmen sie wieder sek. und tert. Struktur ein
 - mit Antikörpern (+angehängte Sonde) können sie sichtbar gemacht werden



Co-Immunopräzipitation



D



- Gebundene Proteinuntereinheiten können mit ausfallen
- Untersuchung der ASK1/2 – TIR1Konjugation
- *tir1-1* Mutante wird mit TIR1myc Epitop getagged
- Antiserum für TIR1myc wird nach/vor Western Blot zugesetzt
- Nachweis von ASK mit den spezifischen Antikörpern
- →ASK bindet auch an *tir1-1* Mutante

A

```

AtCul1  -----  MERKTDL  GWDYNGQST  LKERILGSL
HeCul-4A -----  MERKTDL  GWDYNGQST  LKERILGSL
Cde53  -----  MERKTDL  GWDYNGQST  LKERILGSL

AtCul1  -----  KPAFDSEQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ
HeCul-4A -----  KPAFDSEQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ
Cde53  -----  VYEAIVHYCV  NKSRSSGQFS  QDSRQSQST  LKGRITKYL  KKHINSTYQ

AtCul1  -----  ALRERHSDYH  DRELPAEEN  KKNVYVDE  FVQDSEFE  -----  AKD
HeCul-4A -----  ALRERHSDYH  DRELPAEEN  KKNVYVDE  FVQDSEFE  -----  AKD
Cde53  -----  HFKQHSQYF  QKPTVDEER  FVQDSEFE  AKDSEFE  -----  AKD

AtCul1  -----  LVPFDEYV  CFPRDEPHEL  KKKVYVDE  LKSEDEFE  -----  AKD
HeCul-4A -----  LVPFDEYV  CFPRDEPHEL  KKKVYVDE  LKSEDEFE  -----  AKD
Cde53  -----  LVPFDEYV  CFPRDEPHEL  KKKVYVDE  LKSEDEFE  -----  AKD

AtCul1  -----  DIVYDEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD
HeCul-4A -----  DIVYDEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD
Cde53  -----  KSLDEYV  QDLKSLHAY  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD

AtCul1  -----  DYLKSEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD
HeCul-4A -----  DYLKSEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD
Cde53  -----  DYLKSEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD

AtCul1  -----  HFKQHSQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ
HeCul-4A -----  HFKQHSQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ
Cde53  -----  HFKQHSQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ

AtCul1  -----  KPAFDSEQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ
HeCul-4A -----  KPAFDSEQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ
Cde53  -----  KPAFDSEQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ

AtCul1  -----  LVPFDEYV  CFPRDEPHEL  KKKVYVDE  LKSEDEFE  -----  AKD
HeCul-4A -----  LVPFDEYV  CFPRDEPHEL  KKKVYVDE  LKSEDEFE  -----  AKD
Cde53  -----  LVPFDEYV  CFPRDEPHEL  KKKVYVDE  LKSEDEFE  -----  AKD

AtCul1  -----  DIVYDEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD
HeCul-4A -----  DIVYDEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD
Cde53  -----  DIVYDEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD

AtCul1  -----  DYLKSEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD
HeCul-4A -----  DYLKSEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD
Cde53  -----  DYLKSEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD

AtCul1  -----  HFKQHSQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ
HeCul-4A -----  HFKQHSQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ
Cde53  -----  HFKQHSQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ

AtCul1  -----  KPAFDSEQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ
HeCul-4A -----  KPAFDSEQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ
Cde53  -----  KPAFDSEQYH  MLTYEIVH  QKPRHEDYQ  QLYKTYAF  KKHINSTYQ

AtCul1  -----  LVPFDEYV  CFPRDEPHEL  KKKVYVDE  LKSEDEFE  -----  AKD
HeCul-4A -----  LVPFDEYV  CFPRDEPHEL  KKKVYVDE  LKSEDEFE  -----  AKD
Cde53  -----  LVPFDEYV  CFPRDEPHEL  KKKVYVDE  LKSEDEFE  -----  AKD

AtCul1  -----  DIVYDEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD
HeCul-4A -----  DIVYDEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD
Cde53  -----  DIVYDEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD

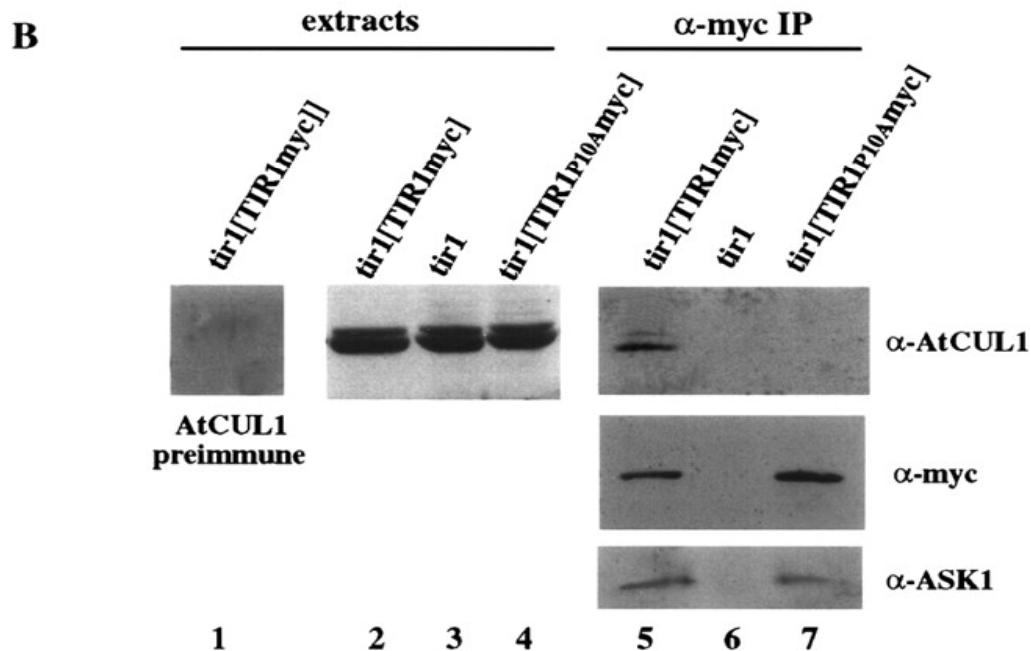
AtCul1  -----  DYLKSEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD
HeCul-4A -----  DYLKSEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD
Cde53  -----  DYLKSEYV  -----  KSR  DESEDEFE  QKPRHEDYQ  AKHSDYQ  -----  AKD

```

- Sequenzanalyse anderer Culline in Mammalia und Hefen(SCF bekannt) führten zu AtCul1
- Co-Immunopräzipitation mit weiterer Mutante TIR1_{P10A} (hochkonserviertes Prolin an 10.Stelle zu Alaninrest) und neuem Antiserum α-AtCul1

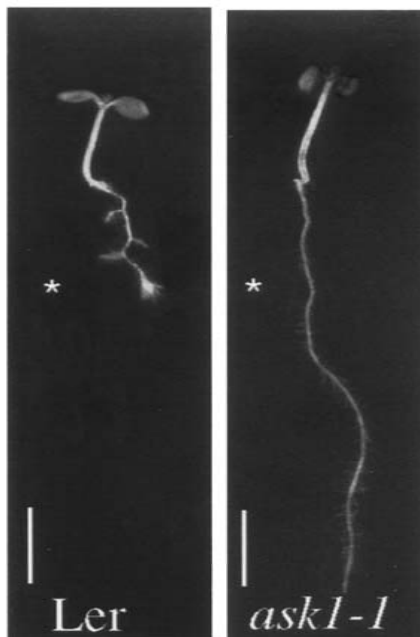
Folgerung: -TIR1 bindet über die F-Box AtCul1

ASK wird an F-Box und an anderer Stelle gebunden (in Y2H-System war dies nicht zu beobachten)



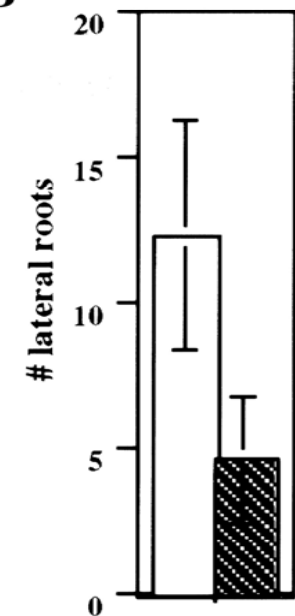
ASK ist für Auxinantwort nötig

A

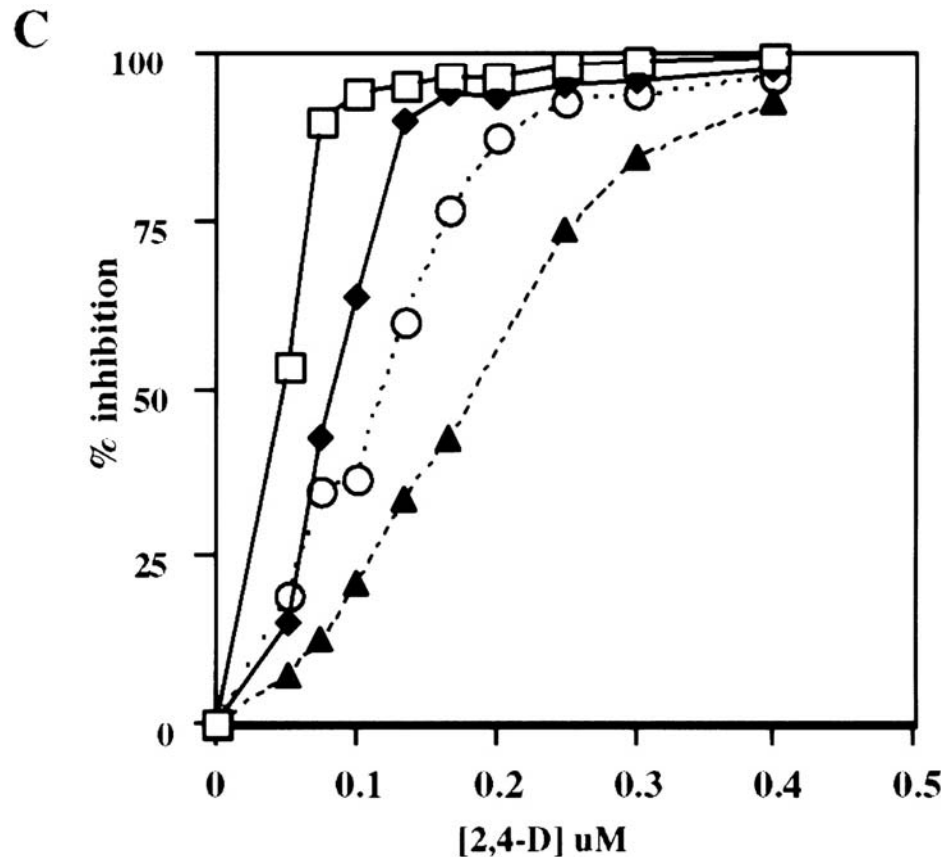


- Durch konjugation von ASK mit TIR1 wird ASK im Auxinresponse vermutet ; *ask1-1* Mutante bestätigt dies
- Ausprägung von Seitenwurzeln in *ask1-1* deutlich vermindert(offener Balken ASK1, schraffierter *ask1*)
- Teil der *ask1* Mutanten weißt keine Auxinresistenz auf; weißt auf unvollständige Penetranz hin

B

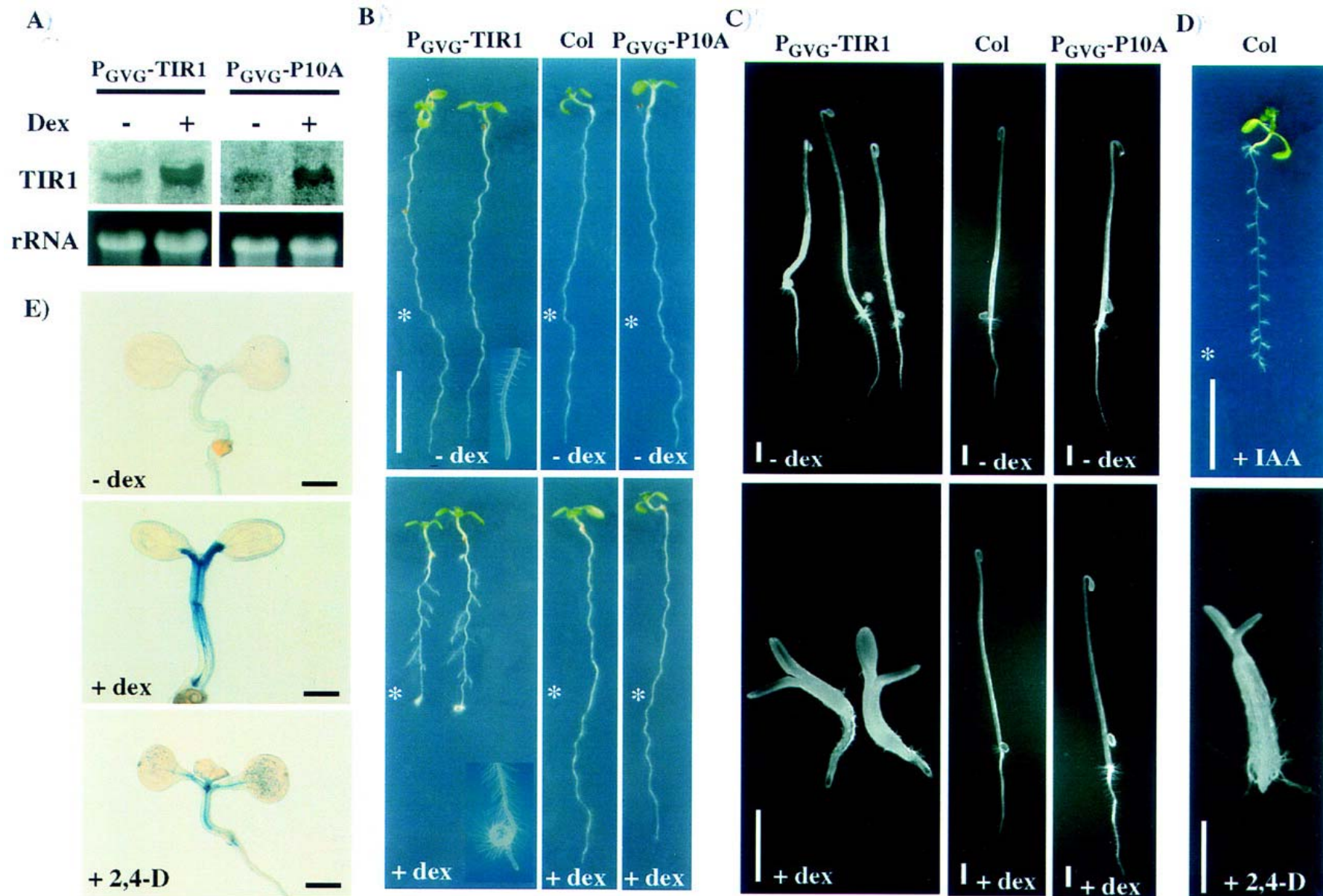


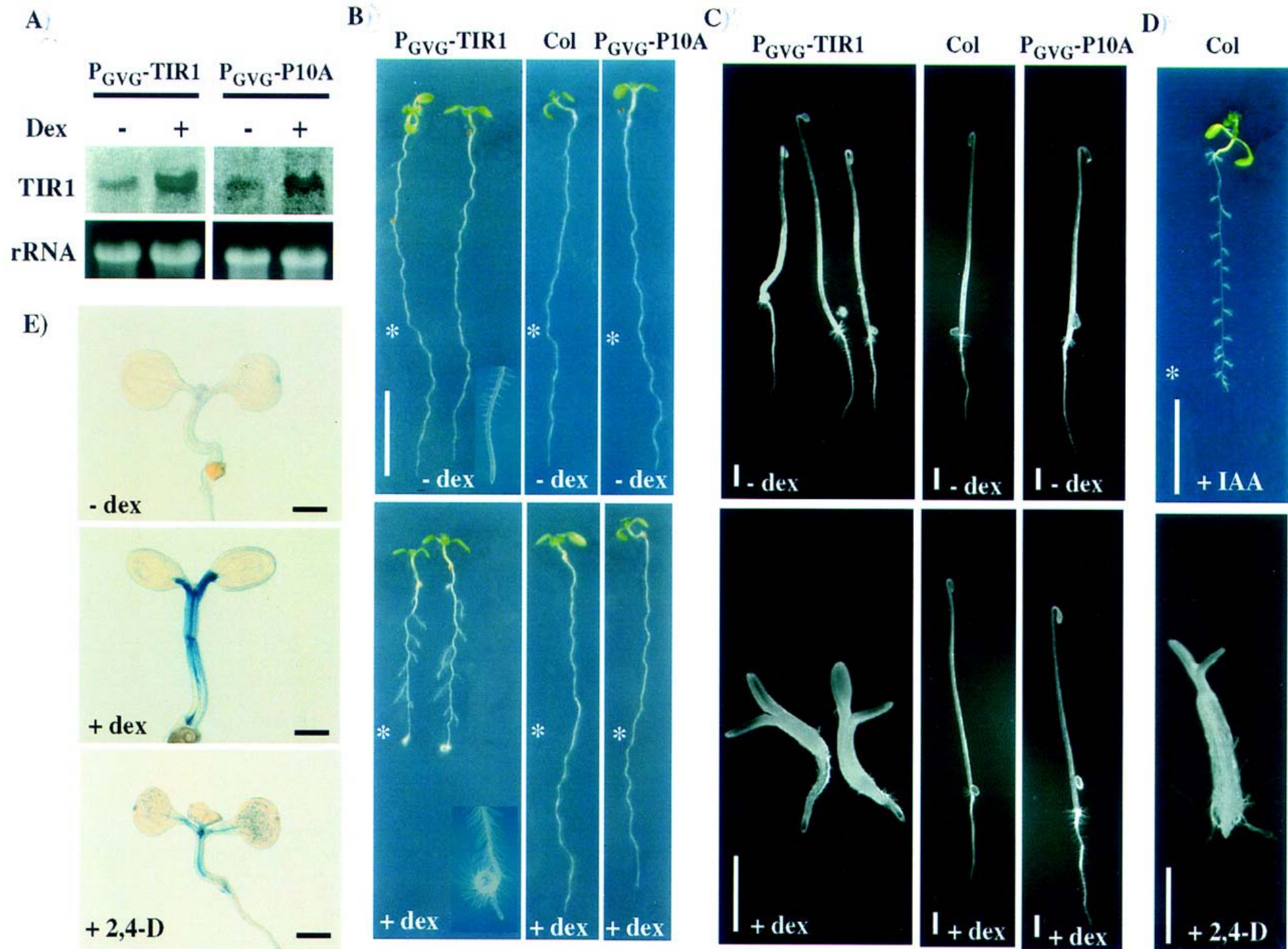
Phänotypen



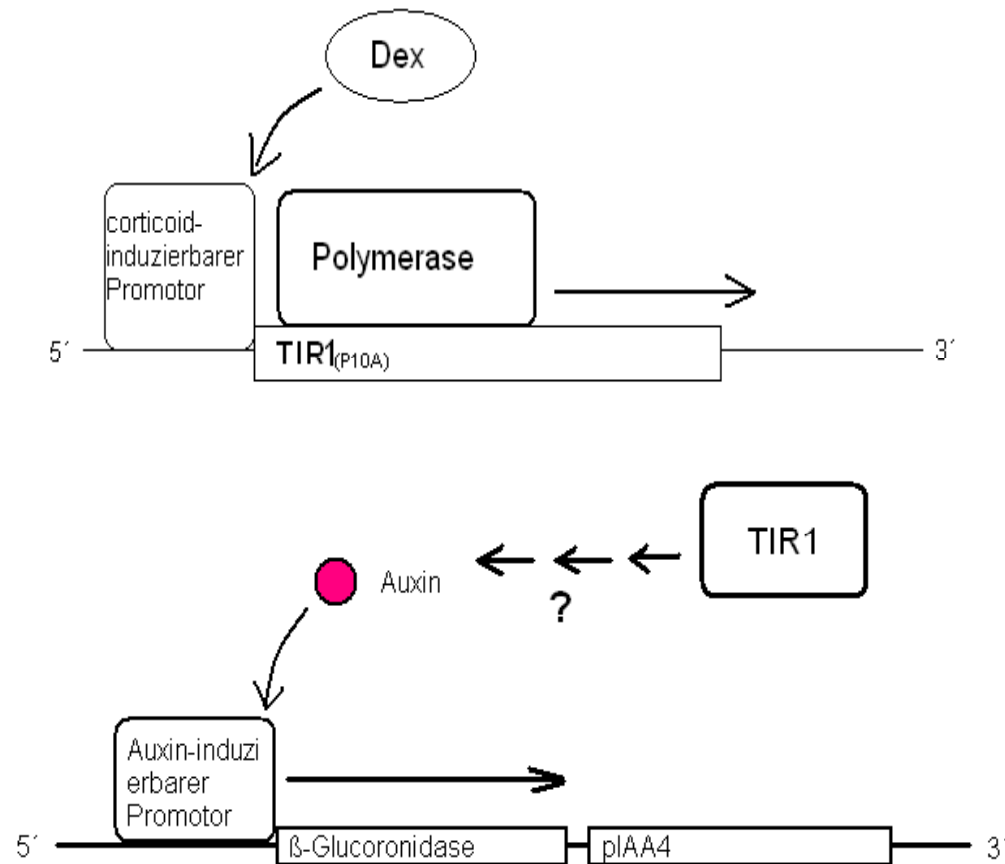
- □ WT Ler
- ◆ tir1-1
- ○ ask1-1
- ▲ tir1-1/ask1-1
- ask1-1 resistenter als tir1-1
- ask1-1/tir1-1 am resistenter einzeln

Überexpremierung von TIR1 fördert Auxinresponse





An Glucocorticoid-induzierten Promotor gekoppeltes pIAA-gus Reporter System



.-dex \rightarrow keine gus-Färbung

."+dex \rightarrow Färbung

."+2,4-D \rightarrow Färbung

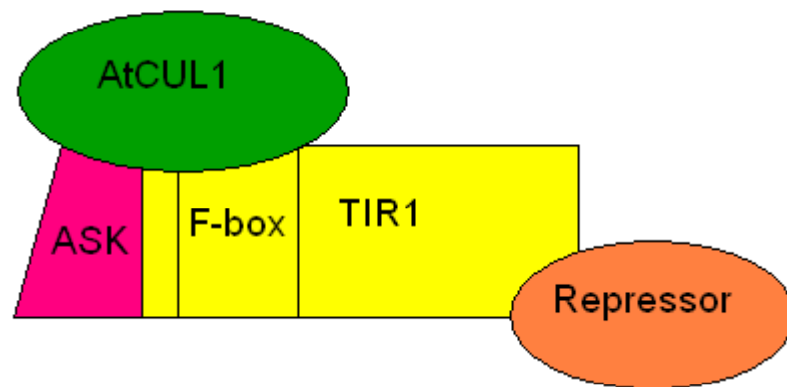
.- \rightarrow **TIR1-Expressierung wirkt auf Auxinexpressierung**

.TIR1-Überexpressierung verstärkt Auxinbildung

.TIR1 greift in Auxinresponse ein

Diskussion

- pIAA-gus-reporter system → Auxin Antwort hängt von Ubiquitin-Ligase-Komplex SCFTIR1 (E3) ab
- GAL-reporter system und Co-Immunopräzipitation → E3 besteht aus ASK (Arabidopsis like Skp1) und AtCUL1 und F-Box-Protein TIR1
- Phänotypisch → Mutationen in ASK1 u TIR1 verursachen verminderte Auxinantwort
- Glucocorticoid induzierbarer Promotor → Erhöhte TIR1-Expression fördert Auxinantwort -> SCFTIR1 limitierend für Antwort



- Auxinantwort wahrscheinlich abhängig von regulierter Proteolyse von Repressorproteinen

